



TITLE:

シナプス長期抑圧発現時における AMPA型グルタミン酸受容体の動態 解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

藤井, 俊平

CITATION:

藤井, 俊平. シナプス長期抑圧発現時におけるAMPA型グルタミン酸受容体の動態解析. 京都大学, 2017, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2017-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20555>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2020-07-14に公開

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	藤井 俊平
論文題目	シナプス長期抑圧発現時における AMPA 型グルタミン酸受容体の動態解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>シナプス可塑性は、学習や記憶の細胞レベルの基礎メカニズムと考えられている。海馬では、長期的にシナプス伝達効率が亢進するシナプス長期増強 (Long - Term Potentiation : LTP) と、逆に長期的に抑圧されるシナプス長期抑圧 (Long-Term Depression : LTD)両者が起こることが知られている。</p> <p>興奮性シナプス後膜でシナプス可塑性が発現する一メカニズムとして、シナプス後膜上のAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体)数の増減が挙げられる。シナプス後膜周辺のAMPA受容体の輸送経路には、「エキソサイトーシス」「エンドサイトーシス」「側方移動」の3つがあり、これらの輸送経路を介して、シナプス後膜上の受容体数が変化している。これらのうち、個々のエンドサイトーシスの観察は困難であったため、その生起頻度などの定量的な解析は行われていなかった。そこで本研究では、AMPA受容体の個々のエンドサイトーシスを可視化し、海馬のLTD発現時におけるシナプス後膜周辺でのAMPA受容体の動態を明らかにすることをめざした。</p> <p>これまでの研究で、シナプス後膜の形成を誘導できるニューレキシンでコートしたカバーガラス面上にラット海馬神経細胞の分散培養を行うことで、シナプス後膜様構造PSLM (Post-synaptic like membrane) を全反射顕微鏡の観察領域であるガラス面直上に形成させる実験系が構築されていた。本研究ではこの実験系に加え、pH感受性蛍光タンパク質であるSEP (Super ecliptic pHluorin)で標識したAMPA受容体と、U字管による瞬間的・断続的な細胞外液のpH変更を行う手法を組み合わせ、PSLM周辺でエンドサイトーシスされたSEP標識AMPA受容体の動態を観察した。</p> <p>まず、定常状態におけるAMPA受容体のエンドサイトーシスを調べた。クラスリン依存的にエンドサイトーシスされるトランスフェリン受容体と比較しつつ薬理阻害実験を行い、定常状態のAMPA受容体のエンドサイトーシスは、クラスリン・ダイナミンに依存せずに起こることを示した。次に、LTD発現時のAMPA受容体の動態を解析した。NMDA投与によるLTD誘導を行い、細胞外と細胞内のSEP蛍光標識した受容体の蛍光をpH変更により区別し、膜表面の受容体の蛍光のみを精確に推定したところ、膜表面の受容体数は、LTD誘導後10分程度の時間をかけてゆっくりと減少することがわかった。次に、個々のエンドサイトーシスの観察を行い、LTD誘導刺激直後にはクラスリン・ダイナミン依存的なエンドサイトーシスがPSLM周辺で約1分間増加し、その後は定常時よりも減少することを示した。さらに、LTD誘導刺激時のエキソサイトーシスの頻度を調べたところ、エンドサイトーシスと同様にLTD誘導直後の約1分間、PSLM領域において頻度が上昇し、その後はPSLM外領域でエキソサイトーシス頻度が減少した。これらの結果から、LTD発現時の緩やかな細胞膜上のAMPA受容体数の減少は、エンドサイトーシスの亢進ではなく、エキソサイトーシス頻度の減少により引き起こされると推察した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

動物の学習・記憶の細胞レベルのメカニズムとして、神経細胞間のシナプスでの情報伝達が神経活動依存的に変化する現象であるシナプス可塑性が知られている。シナプス可塑性には伝達効率が持続的に亢進する長期増強 (Long - Term Potentiation, LTP) と、減弱する長期抑圧 (Long-Term Depression, LTD)がある。そして、LTPまたはLTD発現の主要メカニズムとして、シナプス後部での伝達物質受容体数の増減が知られている。受容体数の増減には、細胞内から細胞膜への受容体の移動であるエキソサイトーシスと、細胞膜から細胞内へ受容体を取り込まれるエンドサイトーシスが関与し、これまではLTPにはエキソサイトーシスの亢進が、LTDにはエンドサイトーシスの亢進が重要と考えられてきたが、その詳細は不明であった。特にエンドサイトーシスについては、伝達物質受容体の個々のエンドサイトーシスがいつ、どこで、どのように起こるかが不明であった。

藤井俊平は、LTD発現時の伝達物質受容体動態を解明するために、海馬領域のグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスにおけるAMPA型グルタミン酸受容体動態の解明を目指した。そして、高いシグナル・ノイズ比・高時空間分解能で、蛍光標識したAMPA型グルタミン酸受容体の個々エンドサイトーシスと細胞膜上の量を、シナプス後部内外で定量的に解析できるlive-cell imagingの新実験手法を開発した。その上で、LTD発現時のAMPA型グルタミン酸受容体の細胞膜上の量・エンドサイトーシス頻度・エキソサイトーシス頻度を定量的に調べて、LTD発現にはAMPA型グルタミン酸受容体のエキソサイトーシスの抑制が重要であることを示唆する実験結果を得た。この結果は、LTD発現機構に関するこれまでの通説とは異なるもので、重要な新知見と考えられる。

本研究により、シナプス後部内外でのAMPA型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスおよび細胞膜上の量を、定量的に解析できる新実験手法が確立した。また、LTDの発現にAMPA型グルタミン酸受容体のエキソサイトーシス抑制が大きな寄与をすることが示唆された。これらの研究成果は、グルタミン酸性シナプス後部で起こる可塑性発現の分子機構解明に大きな寄与をする重要な成果と考えられ、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成29年4月18日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降